

重组人载脂蛋白 ApoA-I 表达条件的优化*

马文峰 丁满生 郭美锦 庄英萍** 储 炬 张嗣良

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室国家生化工程技术研究中心 上海 200237)

摘要: 对大肠杆菌 DH5 α 发酵培养表达人载脂蛋白 ApoA-I 的发酵条件进行了优化研究。结果表明: 将重组质粒 pBV220-ApoA-I 转化不同的大肠杆菌宿主菌, 筛选得高表达水平的 *E. coli* DH5 α /pBV220-ApoA-I 表达系统, 摇瓶发酵表达率为 22.2%, BL21 (DE3) 的表达水平与其相当, 而 TG1 的表达率只有 11%。在 FMG-5L 发酵罐进行发酵条件优化, 认为细胞生长培养的最适 pH 为 7.0, 重组 ApoA-I 表达时的最适 pH 为 7.4。分批发酵的初始糖浓度为 $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 且碳氮源的最佳比例为 2:1, 使重组 ApoA-I 表达率达总蛋白的 40%, 浓度达 $2.86 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词: 重组人载脂蛋白 ApoA-I, 大肠杆菌, 优化, 碳氮源比

中图分类号: TQ920.6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 06-0027-06

Optimization of the Fermentation Conditions for Human Apolipoprotein A-I Expression*

MA Wen-Feng DING Man-Sheng GUO Mei-Jin ZHUANG Ying-Ping** CHU Ju ZHANG Si-Liang

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, National Research Center for Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract: Optimization of the fermentation condition for human apolipoprotein A-I expression in recombinant *Escherichia coli* was investigated. The recombinant plasmid pBV220-ApoA-I was transformed respectively into different *E. coli* hosts such as JM109, BL21 (DE3), DH5 α , BMH7118, and TG1. The best host *E. coli* was DH5 α in which the recombinant ApoA-I expression percentage was 21.2% corresponding to that in BL21 (DE3) in flask shaker cultivation, while the ApoA-I expressed percentage in *E. coli* TG1 was 11%. Fed-batch cultivation was performed in FMG-5L fermentor, the optimum fermentation cultivation conditions were as following: optimum pH value was 7.0 in growth phase and 7.4 in the expression phase. The initial glucose concentration in batch phase was $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. The optimum C/N ratio was 2:1. The recombinant ApoA-I reached about 40% of the total protein, and concentration of ApoA-I was $2.86 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: Recombinant human apolipoprotein A-I, *E. coli*, Optimization, C/N ratio

载脂蛋白 (apolipoprotein A-I, ApoA-I) 是高密度脂蛋白 (HDL) 的主要蛋白质成分, 占 70% 左右。大量流行病学调查显示高密度脂蛋白 (HDL) 胆固醇水平与动脉粥样硬化的发生呈负相关。升高血浆 ApoA-I 可升高血浆 HDL 含量, 从而表明 ApoA-I 介导了 HDL 的抗动脉粥样硬化作用^[1]。因此, ApoA-I 具有良好的临床应用前景。

目前采用基因重组方法表达 ApoA-I 有真核表达系统和原核表达系统^[2], 真核表达通常采用动物细胞如 s9 和 CHO 细胞, 原核表达系统主要是采用大肠杆菌。利用 CHO 生产 ApoA-I 的表达量低, 仅为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 且培养要求和成本都比较高^[3], 同时考虑到载脂蛋白的生物学功能主要是基于其二级结构, 不需要进行蛋白高级结构修饰, 因此

* 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2002AA217021)

国家重大科技专项资助 (No. 2002AA223451)

** 联系人 Tel: 086-21-64252234, Fax: 086-21-64252234, E-mail: YPZ@nc-bio.com

收稿日期: 2004-01-17, 修回日期: 2004-03-06

目前对重组 ApoA-I 的表达大多是采用大肠杆菌系统。通过构建载体进行转化, 然后筛选高产的重组菌株作为生产用的工程菌。构建载体可采用不同的启动子, 如 λP_L , 及 P_{lac} 等。据报道 ApoA-I 在大肠杆菌表达时容易降解, 一般采用融合表达的形式, 如采用 GST 融合蛋白形式^[4], 表达量为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 构建的 β -半乳糖苷酶融合蛋白, 表达量达到 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本课题采用以包涵体的形式进行表达, 有效防止了蛋白水解酶的水解, 且对细菌的毒性小, 在细菌体内能大量积累。在 FMG-5L 发酵罐上进行发酵条件优化, 使重组 ApoA-I 表达率达总蛋白的 40%, 浓度达 $2.86 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1 材料与方法

1.1 重组质粒与宿主菌

重组质粒 pBV220-ApoA-I 由本室构建和保存, 受 $P_L P_R$ 双重启动子控制, 在 42°C 时能诱导 ApoA-I 蛋白表达。宿主大肠杆菌有 JM109, DH5 α , BMH7118, TG1, BL21 (DE3)。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基: 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 酵母粉 5 g, 定容至 1 L。

1.2.2 分批培养的基础培养基: 蛋白胨 8 g, 葡萄糖 3 g, 酵母粉 8 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 8 g, KH_2PO_4 4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, CaCl_2 0.11 g, 微量元素 (微量元素储备液: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.78 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.85 g, H_3BO_3 0.5 g, 定容至 1 L) 4 mL, 定容至 1 L。

1.2.3 补料培养基: 蛋白胨 8 g, 葡萄糖 3 g, 酵母粉 8 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, 定容至 1 L。

以上除蛋白胨、酵母粉为 OXIDO 公司产品, 其它均为国产产品。

1.3 宿主系统筛选

pBV220-ApoA-I 质粒分别转化 JM109, DH5 α , BL21 (DE3), BMH7118, TG1 感受态细胞, 30°C 培养过夜, 接 $10 \mu\text{L}$ 甘油菌液于 3 mL 种子培养基试管中, 30°C 200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6 左右, 42°C 诱导表达 3 h。

1.4 补料分批高密度发酵

将 $30 \mu\text{L}$ 甘油种子菌接种于盛有 200 mL 种子培养基中的 500 mL 摇瓶中, 220 r/min, 30°C 培养 18 h, OD_{600} 约 2.0 左右, 然后按 1% 的接种量接于 FMG-5L 发酵罐 (国家生化工程技术研究中心研制) 中。细胞生长温度控制为 30°C , pH 采用氨水闭环控制, 溶解氧浓度通过调整搅拌速度使其在整个发酵过程中控制在 30% 以上, 当批发酵结束后, DO 在 1 min 上升至 60% 以上, 则开始进行补料发酵, 使葡萄糖浓度维持在 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下。当细胞达到一定密度后 30 min 内升温至 42°C 进行诱导表达。

1.5 分析方法

1.5.1 细胞光密度及重量测定: 采用比色法, 将培养液稀释到一定倍数, 在分光光度计上于波长 600 nm 处测定光密度值, $OD_{600} = \text{光密度值} \times \text{稀释倍数}$ 。

1.5.2 发酵液中葡萄糖浓度的测定: 葡萄糖试剂盒。

1.5.3 重组 ApoA-I 分析方法: 分别以 SDS-PAGE 分析, 考马斯亮蓝 (R-250) 染色后扫描分析和 ELISA 对目的蛋白进行定性和定量的分析^[5]。

2 结果与讨论

2.1 宿主菌筛选

制备用于表达的感受态大肠杆菌: JM109、BMH7118、DH5 α 、BL21 (DE3)、TG1, 将重组质粒 pBV220-ApoA-I 分别转化至上述五种不同的宿主菌中, 摇瓶培养到对数生长中后期, 升温至 42 $^{\circ}$ C 进行诱导表达重组蛋白。结果经 SDS-PAGE (图 1) 和 ELISA (表 1) 定量分析可知目的蛋白在 DH5 α 中表达量最高, 表达率占总蛋白的 21.2%, BL21 (DE3) 的表达量与 DH5 α 接近, 表达率达到 20.4%, 而 TG1 的表达率则较低, 只有 11%。因此, DH5 α 是最优的宿主表达系统。

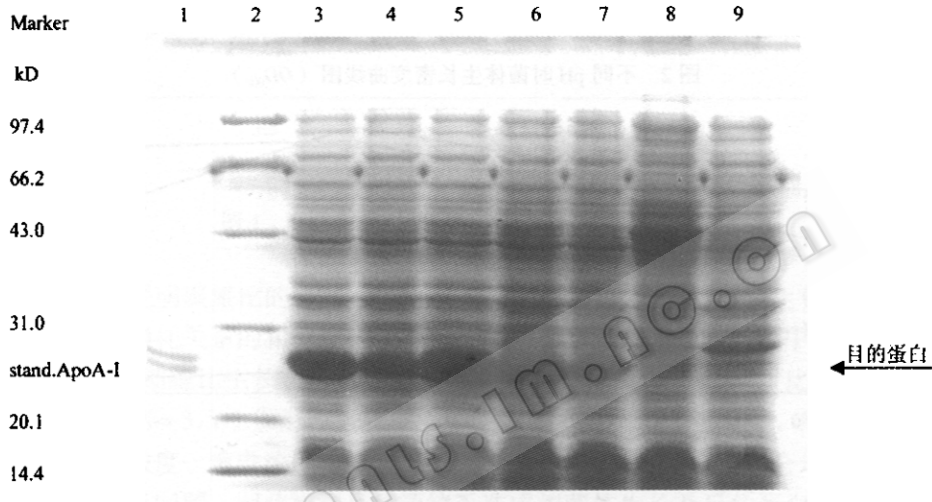


图 1 不同 *E. coli* 宿主系统表达 ApoA-I 的 SDS-PAGE 图

1 ApoA-I 标准样品, 2 Marker, 3~7 JM109, BMH7118, DH5 α , BL21 (DE3), TG1 诱导 5h 后的电泳条带, 8 诱导前的电泳条带, 9 空载体的电泳条带

表 1 重组 ApoA-I 在不同宿主系统表达结果

宿主菌	TG1	JM109	BMH7118	DH5 α	BL21 (DE3)
ApoA-I (%)	11.0	19.3	14.3	21.2	20.4

2.2 分批发酵培养过程中 pH 的影响

发酵过程中, 培养基的 pH 直接影响培养基中某些营养物质及中间代谢产物的解离, 还影响底物分子的带电状况, 从而进一步影响酶的合成, 使细胞代谢和细胞透性发生变化, 因此, 影响菌体对营养物质的吸收、利用^[6]。所以, 工程菌发酵过程中需优化菌体生长及目的蛋白表达时的最适 pH。

将工程菌种子接种于不同 pH 的发酵培养基中进行分批培养, 8 h 后, 测定细胞光密度 (OD_{600})。结果见 (图 2)。pH 为 7.0 时, 细胞密度最高, 其 OD_{600} 达 7.5 左右; 而当 pH 为 7.0~8.0 时, 细胞 OD_{600} 反而明显下降。因此, 菌体生长的最适 pH 为 7.0。

将细胞在 pH 为 7.0 分批发酵结束后, 控制不同的 pH, 升高温度进行诱导表达培养 5 h, 结果如图 3。当 pH 在 7.0~7.6 范围时, 随着 pH 增大, 最终培养的细胞 OD_{600} 是逐渐下降, 但目的蛋白表达率是随 pH 7.0~7.4 的增大而增加, 而 pH 为 7.6 时, 表达率急剧下降了 9.6%, 因此, 重组 ApoA-I 表达的最佳 pH 为 7.4。

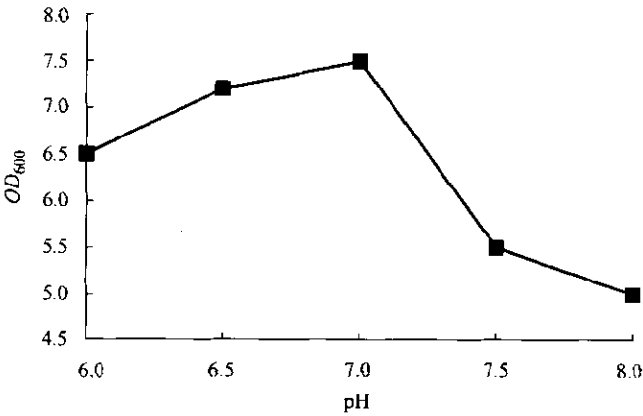


图 2 不同 pH 时菌体生长密度曲线图 (OD₆₀₀)

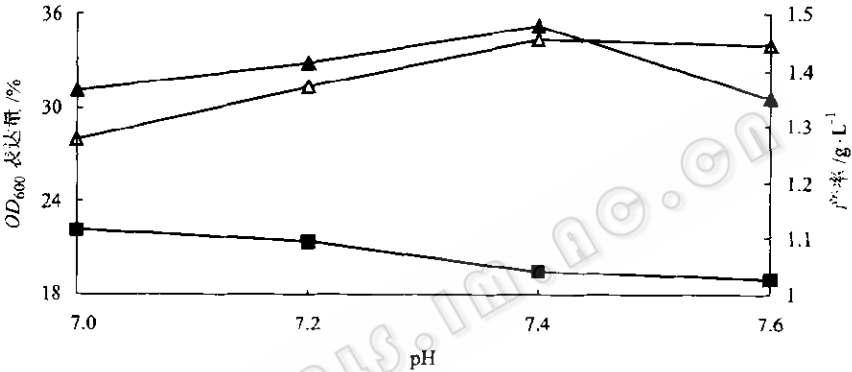


图 3 pH 对重组 ApoA-I 在 *E. coli* DH5α 中表达的影响

■ OD₆₀₀, ● 表达量 (%), ▲ 产率 g·L⁻¹

表 2 不同初糖浓度优化结果

初始糖浓度 (g·L ⁻¹)	OD ₆₀₀	ApoA-I (%)
6.0	15.5	34.4
4.0	18.2	37.5
3.0	19.5	40.0
2.0	14.0	30.0
1.0	11.5	18.7

2.3 不同初糖浓度的优化

根据 pH 优化结果,即细胞生长时控制 pH 为 7.0,诱导阶段 pH 控制为 7.4,在 5 L 罐上进行了 5 种不同初糖浓度的实验,实验结果见表 2。从表中可知,当葡萄糖浓度从 1.0 g·L⁻¹增加到 3.0 g·L⁻¹时,细胞的光密度 (OD₆₀₀) 和重组 ApoA-I 表达率均增加;当葡萄糖浓度由 3.0 g·L⁻¹增加到 6.0 g·L⁻¹时,细胞光密度和重组 ApoA-I 表达率均逐渐下降。因此初糖浓度以 3.0g·L⁻¹为最好。

2.4 培养基中不同碳氮比 (C:N) 对菌体生长及表达的影响

在用大肠杆菌表达外源基因的培养基中,碳氮源的选择及其合适的比例对菌体的生长和外源基因的表达有着非常重要的作用。本实验使用培养基由于有酵母粉、蛋白胨,所以 C:N 的计算是以葡萄糖中的碳 (g) 和有机氮源中的总氮 (g) 为标准。根据前面培养条件优化结果,以初糖浓度 3g·L⁻¹不变,在 5 L 罐上进行了一系列 C:N 的实验,其余菌体生长及目的蛋白表达所需的碳、氮源以一定的比例根据发酵液中的残糖浓度控制流加,发酵结果如图 4 所示。随着 C:N 由 1:1 增加到 2:1 时,细胞生长光密度

和目的蛋白表达率均显著增加, 这表明了细胞对碳源的需求远大于对氮源的需求, 也说明此时氮源不是限制因素, 当 C:N 大于 2:1 后, 细胞密度和重组 ApoA-I 的表达率显著减少, 即随着氮源的减少, 细胞密度和表达率减少, 说明此时氮源为限制性浓度。在 C:N 为 2:1 时, 细胞光密度 (OD_{600}) 达 25, 目的蛋白表达率达 45% 左右, 比初糖浓度不优化氮源 (表 2) 时提高了 12.5% 的表达率, 细胞光密度也提高了 28.2%。由此得出合适的 C:N 比例对菌体的生长和外源基因的表达都很重要。本实验最合适的碳氮比为 2:1。

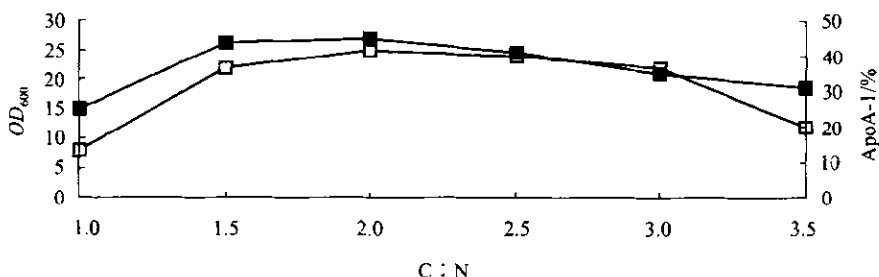


图 4 不同 C:N 对菌体的生长及 ApoA-I 表达的影响

— OD_{600} , —■ ApoA-I (%)

为进一步说明碳氮比的合理性, 通过不同 C:N 下的诱导后的比生长速率和产物形成及基质的比消耗关系的相关性进行分析, 如图 5 为 C:N 为 2:1 (图中实线) 和 3.5:1 (图中虚线) 时细胞比生长速率 (μ)、比产物形成速率 (Q_p) 及基质比消耗速率 (Q_s) 关系图。当 C:N = 3.5:1 发酵时, 诱导 1 h 时, μ_2 、 Q_{p2} 及 Q_{s2} 均下降, 经试验测得总糖浓度、还原糖浓度、溶磷浓度等均充足 (数据未列), 又由于使用复合培养基, 不存在营养因子的缺乏问题, 因此推测是氮源缺乏造成的菌体生长及目的蛋白表达受到限制; 当 C:N 由 4:1 改为 2:1 后, 即增加了氮源的浓度, 诱导 1 h 以后 μ_L 增加, Q_{s1} 基本不变, 而 Q_{p1} 增加, 从而验证了氮源不足而引起细胞生长和目的蛋白表达的限制。

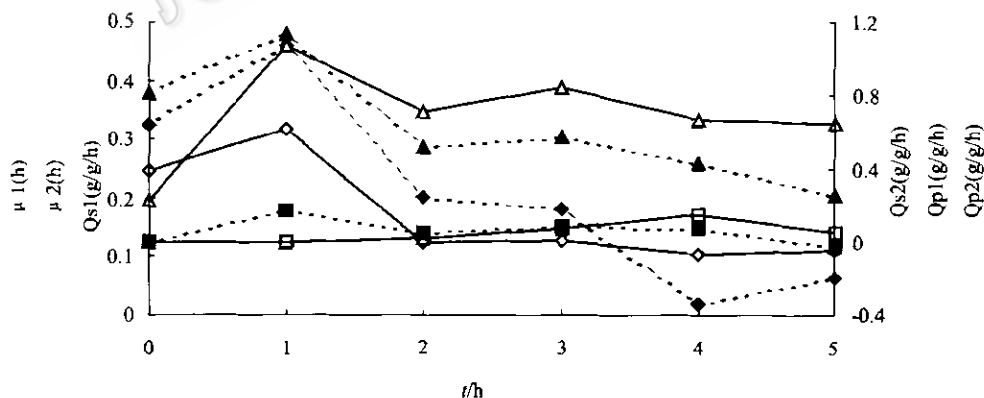


图 5 不同 C:N 诱导后的 μ 、 Q_s 、 Q_p 之间的关系

— μ_1 (h⁻¹), — μ_2 (h⁻¹), — Q_{s1} g·g⁻¹·L⁻¹, — Q_{s2} g·g⁻¹·L⁻¹, — Q_{p1} g·g⁻¹·L⁻¹, — Q_{p2} g·g⁻¹·L⁻¹

3 讨论

环境因素对菌体生长及目的蛋白的表达的影响很大, 特别是培养环境的 pH 及培养

基的 C:N 等的控制直接影响到重组菌的高密度及目的蛋白的高表达。

诱导阶段 pH 对目的蛋白的表达影响很大, 本实验结果是 pH 在 7.4 时, 重组 ApoA-I 表达率最高。Sanjoy K 等^[7]也有类似的报道, 其原因之一可能是在 pH7.4 左右, 质粒拷贝数达到最大, 从而有利于外源蛋白如 ApoA-I 的高表达; 原因之二可能是诱导后由于温度的升高产生了代谢负担, 需要大量的能量, 但由三羧酸循环和呼吸链提供的能量满足不了菌体对能量的需求^[8], 于是, 通过乙酸发酵来补充能量从而会使代谢副产物乙酸浓度迅速升高, 由于乙酸对菌体的毒性是 pH 依赖型的, 乙酸在中性 pH 环境中以离子化 (CH_3COO^-) 和质子化 (CH_3COOH) 两种形式存在, 质子化的乙酸具有弱的亲脂性可以穿过细胞质膜进入胞内, 在胞内弱碱性环境下 (pH7.4) 解离成 CH_3COO^- 和 H^+ , 从而降低膜内的 pH 值, 使膜内外的 pH 差减小, 减弱了质子推动力, 产生的能量就大大减少了, 扰乱了细胞的正常代谢和生理活性, 从而影响了重组蛋白的表达, 而在诱导后较高的 pH, 即 pH 为弱碱性时 (如 pH 为 7.4), 胞外的乙酸均以离子化形式存在, 这样则可减少质子化的乙酸形成, 即可减少质子化的乙酸进入细胞内, 从而缓解乙酸对细胞生长及外源蛋白表达的抑制作用^[9]。

合适的碳氮比例对菌体的生长和外源基因的表达有着非常重要的作用。Sanjoy K B 等人^[7]阐明了高浓度的碳源、氮源明显对菌体的生长及克隆基因表达有抑制作用; 在发酵过程中, C:N 不合适, 将导致菌体比生长速率降低, 目的蛋白的表达率降低 (35% ~ 50%), 表达效率也相对降低 (45% ~ 60%), 原因是由于 C:N 不合适, 不仅菌体代谢失调从而影响菌体的生长, 而且影响质粒拷贝数因此影响质粒浓度而导致目的蛋白表达量降低; Toshihide Kakozono 等人也曾报道较低的 C:N, 造成细胞 DNA 及蛋白质浓度降低, 不利于目的产物的生成; 李民等人^[10]报道 C:N 比较合适, 但 C、N 浓度过高或过低, 都会影响菌体细胞的繁殖。所以, 只有 C:N 适量才能使细胞生长好, 外源蛋白表达亦高, 又不导致碳源或氮源的浪费。本实验最合适的碳氮比为 2:1, 在保证发酵初糖浓度为 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的批培养前提下, 其余菌体生长及目的蛋白表达所需的碳、氮源以一定的比例根据发酵液中的残糖浓度控制流加, 从而满足细胞生长和重组人载脂蛋白 ApoA-I 表达所需的碳氮源。在本试验优化的条件下, 使重组 ApoA-I 表达率达总蛋白的 40%, 浓度达 $2.86 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

参 考 文 献

- [1] Rubin E M, Krauss R M, Spangler E A, *et al.* Nature, 1991, 353 (6341): 265 ~ 267.
- [2] Hartmut H J, Schmidt R E. Clinica Chimica Acta, 1997, 268 (1 ~ 2): 41 ~ 60.
- [3] Hartmut H J, Schmidt J G. Prot Exp Purif, 1997, 10 (2): 226 ~ 236.
- [4] Liu A C, Lawn R M, Verstuyft J G *et al.* J Lipid Res, 1994, 35 (12): 2263 ~ 2267.
- [5] 李永明等. 实用分子生物学方法手册. 北京: 科学出版社, 1998. 327 ~ 332, 360 ~ 362.
- [6] 姚汝华. 微生物工程工艺原理. 广州: 华南理工大学出版社, 1996.
- [7] Sanjoy K B, Ashok K D. Biotechnol Prog, 1997, 13: 151 ~ 155.
- [8] Han K, Lim H C, Hong J. Biotechnol Bioeng, 1992, 39: 663 ~ 671.
- [9] Joyce D. Appl Biochem and Biotechnol, 1993, 39/40: 301 ~ 322.
- [10] 李 民, 陈常庆. 生物工程学报, 2000, 20: 26 ~ 31.